

E P • U S

P C T

国際調査報告

(法 8 条、法施行規則第40、41条)
[P C T 1 8 条、P C T 規則43、44]

| | | |
|---|---|--------------------------------|
| 出願人又は代理人 P H - 1 2 2 3 の書類記号 - P C T | 今後の手続きについては、国際調査報告の送付通知様式(P C T / I S A / 2 2 0) 及び下記 5 を参照すること。 | |
| 国際出願番号 P C T / J P 0 1 / 0 4 8 7 4 | 国際出願日 (日.月.年) 0 8 . 0 6 . 0 1 | 優先日 (日.月.年) 1 2 . 0 6 . 0 0 |
| 出願人 (氏名又は名称) 日石三菱株式会社 | | |

国際調査機関が作成したこの国際調査報告を法施行規則第41条 (P C T 1 8 条) の規定に従い出願人に送付する。
この写しは国際事務局にも送付される。

この国際調査報告は、全部で 3 ページである。

☐ この調査報告に引用された先行技術文献の写しも添付されている。

1. 国際調査報告の基礎

a. 言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願がされたものに基づき国際調査を行った。

☐ この国際調査機関に提出された国際出願の翻訳文に基づき国際調査を行った。

b. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際調査を行った。

☐ この国際出願に含まれる書面による配列表

☒ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出された書面による配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。

☒ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記載した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

2. ☐ 請求の範囲の一部の調査ができない (第 I 欄参照)。

3. ☐ 発明の単一性が欠如している (第 II 欄参照)。

4. 発明の名称は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 次に示すように国際調査機関が作成した。

5. 要約は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 第 III 欄に示されているように、法施行規則第47条 (P C T 規則38.2(b)) の規定により国際調査機関が作成した。出願人は、この国際調査報告の発送の日から 1 カ月以内にこの国際調査機関に意見を提出することができる。

6. 要約書とともに公表される図は、

第 _____ 図とする。 ☐ 出願人が示したとおりである。

☒ なし

☐ 出願人は図を示さなかった。

☐ 本図は発明の特徴を一層よく表している。

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. C1⁷ C12P23/00

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. C1⁷ C12P23/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

BIOSIS (DIALOG)

GeneBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

C. 関連すると認められる文献

| 引用文献の カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示 | 関連する 請求の範囲の番号 |
|-----------------|---|------------------|
| X | EP 635576 A1 (NIPPON OIL KK) 25. 1月. 1995 (25. 01. 95) & US 5607839 A&NO 9402731 A&JP 7-79796 A | 1-11 |
| X | JP 8-9964 A (日本石油株式会社) 16. 1月. 1996 (16. 01. 96) (ファミリーなし) | 1-11 |
| Y | JP 5-68585 A (ヒガシマル醤油株式会社) 23. 3月. 1993 (23. 03. 93) (ファミリーなし) | 1-4 |
| Y | WO 88/8025 A1 (DANIS-CO BIOTEKNOLOGI) 20. 10月. 1988 (20. 10. 88) & AU 8816889 A&EP 367765 A&US 5356810 A&JP 11-69 | 1-4 |

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

05. 07. 01

国際調査報告の発送日

17.07.01

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

鈴木 恵理子

4N

8114

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

| C (続き) . 関連すると認められる文献 | | |
|-----------------------|---|------------------|
| 引用文献の カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示 | 関連する 請求の範囲の番号 |
| X | 9 6 9 HARTMANN, A. et al. Effect of Carotenoid Overproduction on Oxygen Tolerance of Nitrogen Fixation in <i>Azospirillum brasilense</i> Sp7. Journal of General Microbiology. 1988, Vol. 134, No. 9, p. 2449-2455 | 1, 4 |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/04874

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int.Cl⁷ C12P23/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
Int.Cl⁷ C12P23/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
BIOSIS (DIALOG)
GeneBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|-----------|--|-----------------------|
| X | EP 635576 A1 (Nippon Oil K.K.), 25 January, 1995 (25.01.95), & US 5607839 A & NO 9402731 A & JP 7-79796 A | 1-11 |
| X | JP 8-9964 A (Nippon Oil Company, Ltd.), 16 January, 1996 (16.01.96) (Family: none) | 1-11 |
| Y | JP 5-68585 A (Higashimaru Shoyu K.K.), 23 March, 1993 (23.03.93) (Family: none) | 1-4 |
| Y | WO 88/8025 A1 (Biocolours IS), 20 October, 1988 (20.10.88), & AU 8816889 A & EP 367765 A & US 5356810 A & JP 11-69969 | 1-4 |

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
05 July, 2001 (05.07.01)Date of mailing of the international search report
17 July, 2001 (17.07.01)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/04874

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|-----------|--|-----------------------|
| X | HARTMANN, A. et al., "Effect of Carotenoid Overproduction on Oxygen Tolerance of Nitrogen Fixation in Azospirillum brasilence Sp7", Journal of General Microbiology, (1988), Vol.134, No.9, pages 2449 to 2455 | 1,4 |

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

NOTICE INFORMING THE APPLICANT OF THE
COMMUNICATION OF THE INTERNATIONAL
APPLICATION TO THE DESIGNATED OFFICES

(PCT Rule 47.1(c), first sentence)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

HIRAKI, Yusuke
Toranomon No.5 Mori Building Third
Floor, 17-1, Toranomon 1-chome
Minato-ku, Tokyo 105-0001
JAPON

| | | |
|---|---|---|
| Date of mailing (day/month/year) 20 December 2001 (20.12.01) | | |
| Applicant's or agent's file reference PH-1223-PCT | | |
| International application No. PCT/JP01/04874 | International filing date (day/month/year) 08 June 2001 (08.06.01) | Priority date (day/month/year) 12 June 2000 (12.06.00) |
| Applicant NIPPON MITSUBISHI OIL CORPORATION et al | | |



IMPORTANT NOTICE

1. Notice is hereby given that the International Bureau has **communicated**, as provided in Article 20, the international application to the following designated Offices on the date indicated above as the date of mailing of this notice:

KR,US

In accordance with Rule 47.1(c), third sentence, those Offices will accept the present notice as conclusive evidence that the communication of the international application has duly taken place on the date of mailing indicated above and no copy of the international application is required to be furnished by the applicant to the designated Office(s).

2. The following designated Offices have waived the requirement for such a communication at this time:

AU,CA,CN,EP,IL

The communication will be made to those Offices only upon their request. Furthermore, those Offices do not require the applicant to furnish a copy of the international application (Rule 49.1(a-bis)).

3. Enclosed with this notice is a copy of the international application as published by the International Bureau on 20 December 2001 (20.12.01) under No. WO 01/96591

REMINDER REGARDING CHAPTER II (Article 31(2)(a) and Rule 54.2)

If the applicant wishes to postpone entry into the national phase until 30 months (or later in some Offices) from the priority date, a **demand for international preliminary examination** must be filed with the competent International Preliminary Examining Authority before the expiration of 19 months from the priority date.

It is the applicant's sole responsibility to monitor the 19-month time limit.

Note that only an applicant who is a national or resident of a PCT Contracting State which is bound by Chapter II has the right to file a demand for international preliminary examination (at present, all PCT Contracting States are bound by Chapter II).

REMINDER REGARDING ENTRY INTO THE NATIONAL PHASE (Article 22 or 39(1))

If the applicant wishes to proceed with the international application in the **national phase**, he must, within 20 months or 30 months, or later in some Offices, perform the acts referred to therein before each designated or elected Office.

For further important information on the time limits and acts to be performed for entering the national phase, see the Annex to Form PCT/IB/301 (Notification of Receipt of Record Copy) and the PCT Applicant's Guide, Volume II.

| | |
|---|------------------------------------|
| The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland | Authorized officer J. Zahra |
| Facsimile No. (41-22) 740.14.35 | Telephone No. (41-22) 338.91.11 |

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2001年12月20日 (20.12.2001)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 01/96591 A1

- (51) 国際特許分類⁷: C12P 23/00 (TSUBOKURA, Akira) [JP/JP]. 水田美能 (MIZUTA, Haruyoshi) [JP/JP]; 〒231-0815 神奈川県横浜市中区千島町8番地 日石三菱株式会社 中央技術研究所内 Kanagawa (JP).
- (21) 国際出願番号: PCT/JP01/04874
- (22) 国際出願日: 2001年6月8日 (08.06.2001)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願2000-175124 2000年6月12日 (12.06.2000) JP
- (74) 代理人: 平木祐輔, 外 (HIRAKI, Yusuke et al.); 〒105-0001 東京都港区虎ノ門一丁目17番1号 虎ノ門5森ビル3F Tokyo (JP).
- (81) 指定国 (国内): AU, CA, CN, IL, KR, US.
- (84) 指定国 (広域): ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR).
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 日石三菱株式会社 (NIPPON MITSUBISHI OIL CORPORATION) [JP/JP]; 〒105-8412 東京都港区西新橋一丁目3番12号 Tokyo (JP).
- 添付公開書類:
— 国際調査報告書
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 坪倉 章
- 2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: PROCESS FOR PRODUCING CAROTENOID PIGMENTS

(54) 発明の名称: カロテノイド色素の製法

(57) Abstract: A process for the microbial production of a plural number of carotenoid compounds wherein the ratio of the carotenoid compounds thus formed is varied. The ratio of the carotenoid compounds thus formed (astaxanthin, adonixanthin, β -carotene, echinenone, canthaxanthin, zeaxanthin, β -cryptoxanthin, 3-hydroxyechinenone, adonirubin, etc.) is varied by controlling the concentration of oxygen dissolved in a liquid culture medium during the culture.

(57) 要約:

複数種のカロテノイド化合物の微生物学的製造法において、産生するカロテノイド化合物の生成割合を変える方法を提供する。培養中の培養液の溶存酸素濃度を制御することにより、アスタキサンチン、アドニキサンチン、 β -カロテン、エキネノン、カンタキサンチン、ゼアキサンチン、 β -クリプトキサンチン、3-ヒドロキシエキネノン、アステロイデノンおよびアドニルビン等のカロテノイド化合物の生成割合を変える。

WO 01/96591 A1

明細書

カロテノイド色素の製法

技術分野

本発明はカロテノイド化合物の微生物学的製造法に関する。詳細には、アスタキサンチン、アドニキサンチン、 β -カロテン、エキネノン、カンタキサンチン、ゼアキサンチン、 β -クリプトキサンチン、3-ヒドロキシエキネノン、アステロイデノン、アドニルビンなどのカロテノイド化合物を製造する方法に関するものである。

背景技術

カロテノイド化合物は天然色素として飼料添加物、食品添加物、医薬品等として有用である。アスタキサンチンは養殖魚であるサケ、マス、マダイ等の体色改善剤のごとき飼料添加物として、また安全な天然食品添加物として産業上の価値が高い。またアドニキサンチンは工業的製造法が確立されることによりアスタキサンチンと同様に飼料添加物、食品添加物、医薬品等としての用途が期待される。さらに β -カロテンは飼料添加物、食品添加物、医薬品等として使用され、カンタキサンチンは、食品添加物、飼料添加物、化粧品等として使用され、ゼアキサンチンは食品添加物、飼料添加物等として使用されている。さらにエキネノン、 β -クリプトキサンチン、3-ヒドロキシエキネノン、アステロイデノン、アドニルビン等も飼料添加物、食品添加物等としての使用が期待される。これらカロテノイド化合物の製造方法としては、化学合成法、微生物による産生方法、天然物からの抽出法などが知られており、すでにアスタキサンチン、カンタキサンチン、 β -カロテンについては化学合成法により得られたものが市販されている。

アスタキサンチンはマダイ、サケ、マス等の魚類およびエビ、カニ、ザリガニ、オキアミ等の甲殻類等に存在しており、これらより抽出することが可能である。また、アスタキサンチンを生産する微生物の例としては、赤色酵母ファフィア・ロドチーマ (*Phaffia rhodozyma*)、ブレヴィバクテリウム (*Brevibacterium*) 属に属する細菌 (Journal of Genaral and

Applied Microbiology, 15, 127, 1969)、新属の細菌E-396株 (FERM BP-4283) (特開平7-79796号公報、特開平8-9964号公報、米国特許第5,607,839号明細書、米国特許第5,858,761号明細書)、細菌アグロバクテリウム・オウランティアクム (Agrobacterium aurantiacum) (特開平7-184688号公報)、緑藻類のヘマトコッカス・プルビアリス (Haematococcus pluviialis) (Phytochemistry, 20, 2561, 1981)、が知られている。また化学合成法では β -カロテンの変換による方法 (Pure Appl. Chem., 57, 741, 1985) およびC15ホスホニウム塩から合成する方法 (Helv. Chim. Acta, 64, 2436, 1981) が知られている。

カンタキサンチンは、ある種のきのこ (Botanical Gazette, 112, 228-232, 1950)、魚類および甲殻類などに存在していることが知られている (水産動物のカロテノイド, 日本水産学会誌, 1978)。また、カンタキサンチンを生産する微生物の例としては、ブレバクテリウム属に属する微生物 (Applied and Environmental Microbiology, 55 (10), 2505, 1989)、ロドコッカス属に属する微生物 (特開平2-138996号公報)、新属の細菌E-396株 (FERM BP-4283) (特開平7-79796号公報、特開平8-9964号公報、米国特許第5,607,839号明細書、米国特許第5,858,761号明細書)、細菌アグロバクテリウム・オウランティアクム (Agrobacterium aurantiacum) (Biosci. Biotechnol. Biochem. 58, 1842, 1994) が知られている。また、化学合成法では β -カロテンの変換による方法 (J. Amer. Chem. Soc., 78, 1427, 1956) および新規な3-オキソ-C15ホスホニウム塩から合成する方法 (Pure Appl. Chem., 51, 875, 1979) が知られている。

アドニキサンチンは金魚やコイ等の魚類に存在していることが知られているが、化学合成法による製造は困難と思われ、工業的製造法は知られていない。アドニキサンチンを生産する微生物の例としては、フラボバクテリウム属 (Flavobacte

rium)、アルカリゲネス属 (Alcaligenes)、シュードモナス属 (Pseudomonas)、アルテロモナス属 (Alteromonas)、ヒポモナス属 (Hyphomonas) およびカリオフアノン属 (Caryophanon) に属する微生物 (特開平6-165684号公報)、新属の細菌E-396株 (FERM BP-4283) (特開平7-79796号公報、特開平8-9964号公報、米国特許第5,607,839号明細書、米国特許第5,858,761号明細書)、細菌アグロバクテリウム・オウランティアクム (Agrobacterium aurantiacum) (Biosci. Biotechnol. Biochem. 5, 1842, 1994) が知られている。

β -カロテンの製造法としては β -ヨノンからの合成 (Pure Appl. Chem., 63 (1), 45, 1979)、ニンジン、サツマイモ、カボチャ等緑黄色野菜からの抽出 (天然着色料ハンドブック、光琳 (1979)、天然着色料ハンドブック編集委員会編) が知られている。 β -カロテンを生産する微生物の例としては、ドナリエラ (Dunaliella) 属藻類、ブラケスラ (Blakeslea) 属のカビ (J. Appl. Bacteriol., 70, 181, 1991)、新属の細菌E-396株 (FERM BP-4283) (特開平7-79796号公報、特開平8-9964号公報、米国特許第5,607,839号明細書、米国特許第5,858,761号明細書)、細菌アグロバクテリウム・オウランティアクム (Agrobacterium aurantiacum) (FEMS Microbiology Letters 128, 139, 1995) が知られている。

エキネノンは、オニヒトデなどのヒトデ類、マダイ等の魚類の内臓、ウニ類、イセエビ等の甲殻類の内臓等、天然物から抽出されている。また、エキネノンを生産する微生物の例としては、新属の細菌E-396株 (FERM BP-4283) (特開平7-79796号公報、特開平8-9964号公報、米国特許第5,607,839号明細書、米国特許第5,858,761号明細書)、アグロバクテリウム・オウランティアクム (Agrobacterium aurantiacum) (FEMS Microbiology Letters 128, 139, 1995) が知られている。

ゼアキサントンの製造法としてはオキソイソホロンの不斉還元により得た光学活性なヒドロキシケトン为原料として用いる化学合成法 (Pure Appl. Chem., 63 (1), 45, 1991)、 トウモロコシの種子から抽出する方法 (生体色素, 1974, 朝倉書店) が知られている。 ゼアキサントンを生産する微生物の例としては、フラボバクテリウム属細菌を用いる方法 (Carotenoids, in Microbial Technology, 2nd edn, Vol. 1, 529-544, New York: Academic Press)、新属の細菌 E-396 株 (FERM BP-4283) (特開平 7-79796 号公報、特開平 8-9964 号公報、米国特許第 5,607,839 号明細書、米国特許第 5,858,761 号明細書)、細菌アグロバクテリウム・オウランティアクム (Agrobacterium aurantiacum) (FEMS Microbiology Letters 128, 139, 1995) が知られている。

しかしながら、前述の化学合成法は、安全性が確証されてない、微生物による産生では生産性が低い、天然物からの抽出ではコストがかかりすぎる等の問題点があった。例えば、アスタキサントンの製造においては、天然物のオキアミやザリガニからの抽出による製造では、含有量が極めて少なく、しかも抽出が困難なことからコストが高い。赤色酵母ファフィア・ロドチーマ (Phaffia rhodozyma) は増殖速度が小さい、生産量が少ない、強固な細胞壁を持つためにアスタキサントンの抽出が困難であるなどの問題があるので、工業化には問題点が多い。緑藻類ヘマトコッカス・プルビアリス (Haematococcus pluvialis) も増殖速度が極めて遅い、雑菌汚染を起こしやすい、抽出が困難などの欠点を有するので、この方法の工業化には問題点が多い。

新属の細菌 E-396 株 (FERM BP-4283) および A-581-1 株 (FERM BP-4671) (特開平 7-79796 号公報、特開平 8-9964 号公報、米国特許第 5,607,839 号明細書、米国特許第 5,858,761 号明細書) は、生産性が高く、増殖速度が速い、抽出が容易であるなどの利点を有するが、それらは複数のカロテノイド化合物、すなわちアスタキサントン、アドニキサントン、 β -カロテン、エキネノン、カンタキサントン、ゼアキサントン、 β -クリプトキサン

チン、3-ヒドロキシエキネノン、アステロイデノンおよびアドニルピンを同時に生成するので、それらの生成割合が培養毎に変動し、安定した比率で色素を生成させることが困難であった。このため、生成した色素混合物を動物飼料等に色調改善剤として使用する際の色調効果にばらつきを生じ、商業的生産に対する障害となっていた。

従って一定の比率のカロテノイド化合物を安定して生産する製造方法が求められていた。

本発明は、このような実状に鑑みなされたものであり、その目的は、カロテノイド化合物の生成割合を制御すると共に、その特定の比率のカロテノイド化合物を安定して生産する製造方法を提供することにある。

発明の開示

本発明者らは、上記の課題を解決すべく種々検討した結果、カロテノイドを産生する微生物の培養において培養中の培養液の溶存酸素を適当な濃度に制御することにより、複数のカロテノイド化合物の生成比率を制御すると共に、その特定の比率のカロテノイド化合物を安定に生産することが可能であることを見だし、本発明に到達した。

本明細書は、本願の優先権の基礎である日本国特許出願、特願2000-175124号の明細書および／また図面に記載される内容を包含する。

発明を実施するための最良の形態

以下、本発明をさらに詳細に説明する。

本発明の方法においては、カロテノイド化合物を産生する微生物が用いられる。このような微生物としては、たとえばカロテノイドを産生する細菌、酵母、かびなどが挙げられる。細菌としては16SリボソームRNAに対応するDNAの塩基配列が配列番号1記載の塩基配列と98%以上の相同性を有する細菌が挙げられる。具体的には、E-396株(FERM BP-4283)およびA-581-1株(FRRM BP-4671)、ならびにE-396株あるいはA-581-1株を変異改良することで得られる各種変異株およびこれら2株の近縁種を挙げることができる。配列

番号1のDNAの塩基配列は、E-396株の16SリボソームRNAに対応するものであり、また配列番号2のDNAの塩基配列は、A-581-1株の16SリボソームRNAに対応するものである。

16S リボソームRNAの塩基配列の相同性に基づいた微生物の分類は近年、微生物の分類の手段として主流になりつつあるが、これは、従来の運動性、栄養要求性、糖の資化性などに基づく分類では、自然突然変異による形質の変化等により誤った同定をされる場合もあるという問題点があったためである。16S リボソームRNAの塩基配列の相同性に基づいた分類では、極めて遺伝的に安定な16S リボソームRNAの塩基配列に基づくため、信頼度が格段に向上する。E-396株とA-581-1株の16S リボソームRNAの塩基配列の相同性は99.4%であり、極めて近縁な株であることが判明した。よって、これらの菌株はカロテノイドを生産する細菌として一つのグループを形成している。E-396株およびA-581-1株ならびに本発明の培養条件によって効果を発揮する菌株は、E-396株あるいはA-581-1株の変異株および近縁種としてE-396株の16S リボソームRNAの塩基配列と98%以上の相同性を有する微生物として定義される。

本発明に使用する具体的な微生物として挙げられるE-396株について説明する。この株は、本発明者らが新しく単離したものであり、独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センター（日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1中央第6）に平成5年4月27日にFERM BP-4283として寄託された。さらに具体的な他の微生物としてはA-581-1株（FERM BP-4671）を挙げることができる。この株は、発明者らが新しく単離したものであり、独立行政法人産業技術総合研

ークリプトキサンチン、3-ヒドロキシエキネノン、アステロイデノン、カンタキサンチン、ゼアキサンチン、アドニルビン、アドニキサンチン、アスタキサンチンを同時に生成する。

生合成は β -カロテンを上流とし、ケト化酵素および水酸化酵素によりそれぞれ両端の6員環が修飾され最終的にはアスタキサンチンが生成すると推定されている。しかしながら培養時間を長くしても、全てがアスタキサンチンに変換されることはなく、それらの化合物が培養終了まで存在する現象が認められていた。またその生成割合は培養毎に一定ではなく、例えば、生合成で上流と思われる β -カロテン、エキネノン、カンタキサンチン、アドニルビン、3-ヒドロキシエキネノンの生成割合が多い場合、アスタキサンチンの生成割合が多い場合、アドニキサンチンの生成割合が多い場合など様々であった。

このため、生成した色素混合物を動物飼料等に色調改善剤として使用する際の色調効果にばらつきを生じ、商品として販売できないことから商業生産のための障害となっていた。そこで種々検討を重ねた結果、生成色素の生成割合に影響を与える因子は、培養液中の溶存酸素であることを見いだした。攪拌回転速度を一定にした培養では、培養液中の溶存酸素濃度は微生物の微妙な酸素消費速度の差に左右され、その結果それぞれの色素の生成割合が培養ロット毎にばらついていたことが判明した。この問題を解決するために培養中の培養液中の溶存酸素を制御することにより、生成するカロテノイド化合物すなわち β -カロテン、エキネノン、 β -クリプトキサンチン、3-ヒドロキシエキネノン、アステロイデノン、カンタキサンチン、ゼアキサンチン、アドニルビン、アドニキサンチン、アスタキサンチンの生成比率を制御できる。

培養液中の溶存酸素濃度を低く制御すると、生合成で上流と思われる β -カロテン、エキネノン、カンタキサンチン、3-ヒドロキシエキネノンおよびアドニルビンの生成割合を高めることができ、培養液中の溶存酸素濃度を中程度に制御すると、アスタキサンチンの生成割合を高めることができ、また培養液中の溶存酸素濃度を高く制御することによりアドニキサンチンの生成割合を高めることができる。

例えば、アスタキサンチンの生成比率を高めるためには培養液中の溶存酸素濃度を飽和酸素濃度の15~40%、好ましくは20~30%にコントロールする。溶存酸

素濃度が飽和酸素濃度の20～30%の条件下、アスタキサンチンの生成割合を40%以上に高めることができる。

溶存酸素濃度が飽和酸素濃度の0～15%、好ましくは0～10%の範囲では、 β -カロテン、エキネノン、カンタキサンチン、3-ヒドロキシエキネノンおよびアドニルビンが多く蓄積しアスタキサンチンの生成が抑制される。この条件下、 β -カロテン、エキネノン、カンタキサンチン、3-ヒドロキシエキネノンおよびアドニルビンの生成量の合計は60%以上であり、アスタキサンチンの生成割合を40%以下にすることができる。

また、アドニキサンチンの生成比率を高めるためには培養液中の溶存酸素濃度を飽和酸素濃度の35～100%、好ましくは40～100%にコントロールする。この条件によりアドニキサンチンの生成割合を35%以上にすることができる。

また培養フェーズにおいては、対数増殖期において溶存酸素濃度は重要であり、例えばこの時期に溶存酸素濃度を高くすると、その後に低い条件に変えてもアドニキサンチンの生成割合は高くなる。

溶存酸素濃度の制御は通常培養で用いられる方法、例えば溶存酸素電極により測定した培養液中の溶存酸素濃度値に応じて培養槽内に供給する空気あるいは酸素の流量を自動的に調節する方法あるいは溶存酸素電極により測定した培養液中の溶存酸素濃度値に応じて攪拌羽根の回転速度を自動的に調節する方法等いずれの方法も用いることができる。

実施例

以下、実施例により本発明をさらに詳しく説明するが、本発明はこれらの実施例のみに限定されるものではない。

〔実施例1〕

表1の組成からなる培地100mlを500ml容量の三角フラスコに入れ121℃、15分間蒸気殺菌した。これにE-396株(FERM BP-4283)を植菌し28℃で1日間、150rpmの回転振とう培養を行った。次ぎに、この培養液600ml分を表2の組成からなる培地が20L入った30L容量の通気攪拌培養槽

に植菌し 28℃、1.0vvmの好気培養を90時間行った。培養途中のpHは7.2に20%NaOHで連続的に制御した。シュクロースは生育とともに消費されるので培養開始1日目および2日目にそれぞれ300gずつ添加した。培養液中の溶存酸素は、溶存酸素電極と攪拌羽根のモーターとを連動させ、溶存酸素の値に応じて回転速度を変化させる方法により自動制御した。また最低回転速度は80rpmに設定した。

溶存酸素濃度は、その培地における酸素の飽和濃度の比率で、それぞれ5、15、20、25、30、35%に設定した。

各条件における生成したカロテノイド（各化合物の記号を表3に示す）の生成濃度と比率は、表4および表5に示すとおりであった。

表1

| 組成 | 添加量 |
|---|---------|
| コーンスチープリカー | 30g/L |
| シュクロース | 30g/L |
| KH_2PO_4 | 0.54g/L |
| K_2HPO_4 | 2.78g/L |
| $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | 12.0g/L |
| $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ | 0.1g/L |
| $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | 0.3g/L |
| pH7.2 | |

表2

| 組成 | 添加量 |
|--|--------|
| コーンスチープリカー | 30g/L |
| シュクロース | 30g/L |
| KH_2PO_4 | 1.5g/L |
| $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ | 3.8g/L |
| $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | 3.0g/L |
| $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ | 0.2g/L |
| $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | 1.0g/L |
| pH7.2 | |

表 3

| 記号 | 化合物 |
|----|--------------------|
| A | β -カロテン |
| B | エキネノン |
| C | 3-ヒドロキシエキネノン |
| D | カンタキサンチン |
| E | アドニルビン |
| F | β -クリプトキサンチン |
| G | アスタキサンチン |
| H | アステロイデノン |
| I | アドニキサンチン |
| J | ゼアキサンチン |

表 4

| 溶存酸素濃度 % | 色素生成濃度 mg/L | | | | | | | | | | |
|----------|-------------|-----|-----|-----|-----|-----|------|-----|-----|-----|------|
| | A | B | C | D | E | F | G | H | I | J | 合計 |
| 5 | 5.0 | 1.6 | 0.5 | 3.3 | 4.0 | 0.0 | 2.8 | 0.1 | 0.4 | 0.1 | 17.8 |
| 15 | 2.9 | 2.1 | 0.3 | 3.7 | 7.5 | 0.0 | 8.6 | 0.2 | 1.8 | 0.1 | 27.2 |
| 20 | 3.5 | 2.2 | 0.2 | 2.0 | 3.8 | 0.0 | 11.6 | 0.2 | 3.5 | 0.1 | 27.2 |
| 25 | 3.8 | 1.4 | 0.2 | 1.7 | 4.3 | 0.0 | 14.6 | 0.3 | 5.7 | 0.1 | 32.1 |
| 30 | 2.6 | 0.9 | 0.1 | 0.8 | 1.7 | 0.0 | 9.8 | 0.2 | 5.1 | 0.1 | 21.3 |
| 35 | 1.6 | 0.4 | 0.1 | 0.7 | 1.6 | 0.0 | 8.5 | 0.2 | 7.9 | 0.1 | 21.1 |

表 5

| 溶存酸素濃度 % | 前駆体 | | G | | I | |
|----------|------|----|------|----|------|----|
| | mg/L | % | mg/L | % | mg/L | % |
| 5 | 14.6 | 82 | 2.8 | 16 | 0.4 | 2 |
| 15 | 16.8 | 62 | 8.6 | 32 | 1.8 | 7 |
| 20 | 12.1 | 44 | 11.6 | 43 | 3.5 | 13 |
| 25 | 11.8 | 37 | 14.6 | 46 | 5.7 | 18 |
| 30 | 6.4 | 30 | 9.8 | 46 | 5.1 | 24 |
| 35 | 4.7 | 22 | 8.5 | 40 | 7.9 | 37 |

前駆体: A+B+C+D+E+F

〔実施例 2〕

上記表 1 の組成からなる培地 100 ml を 500 ml 容量の三角フラスコに入れ 121℃、15 分間蒸気殺菌した。これに E-396 株 (FERM BP-4283) を植菌し 28℃ で 1 日間、150 rpm の回転振とう培養を行った。次ぎにこの培養

液100ml分を上記表2の組成からなる培地が2L入った5L容量の通気攪拌培養槽に植菌し28℃、1.0vvmの好気培養を90時間行った。培養途中のpHは7.2に20%NaOHで連続的に制御した。シュクロースは生育とともに消費されるので培養開始1日目および2日目にそれぞれ30gずつ添加した。培養液中の溶存酸素は、溶存酸素電極と攪拌羽根のモーターとを連動させ、溶存酸素の値に応じて回転速度を変化させる方法により自動制御した。また最低回転速度は100rpmに設定した。溶存酸素濃度はその培地における酸素の飽和濃度の比率で、25%に設定した。

比較のため溶存酸素を制御しない条件、すなわち攪拌回転速度を450rpm一定での条件での培養も行った。

各条件における生成したカロテノイドの生成濃度は、表6に示すとおりであった。

表6

| 運転番号 | 溶存酸素制御 | 前駆体 | | アスタキサンチン | | アドニキサンチン | | 総色素 | |
|------|------------|------|----|----------|----|----------|----|------|-----|
| | | mg/L | % | mg/L | % | mg/L | % | mg/L | % |
| 1 | なし(450rpm) | 16.5 | 62 | 8.6 | 32 | 1.8 | 7 | 26.8 | 100 |
| 2 | なし(450rpm) | 13.8 | 82 | 2.5 | 15 | 0.5 | 3 | 16.8 | 100 |
| 3 | なし(450rpm) | 6.5 | 29 | 8.9 | 39 | 5.2 | 23 | 22.6 | 100 |
| 4 | なし(450rpm) | 10.6 | 45 | 7.1 | 30 | 6.1 | 26 | 23.8 | 100 |
| 5 | なし(450rpm) | 12.5 | 39 | 14.9 | 47 | 4.6 | 14 | 32.0 | 100 |
| 6 | あり(25%) | 11.5 | 38 | 15.3 | 49 | 4.4 | 14 | 31.2 | 100 |
| 7 | あり(25%) | 12.8 | 41 | 13.5 | 43 | 4.8 | 15 | 31.1 | 100 |
| 8 | あり(25%) | 10.9 | 40 | 11.8 | 43 | 4.5 | 17 | 27.2 | 100 |
| 9 | あり(25%) | 13.2 | 44 | 12.5 | 42 | 4.3 | 14 | 30.0 | 100 |
| 10 | あり(25%) | 9.9 | 36 | 13.2 | 47 | 4.7 | 17 | 27.8 | 100 |

〔実施例3〕

E-396株(FERM BP-4283)をNTG(N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine)で変異処理し、赤色の色調が濃いコロニーを選択した。これらの株の培養液中のカロテノイド化合物を分析し、アスタキサンチンの生産性が向上した変異株Y-1071株を選択した。表1の組成からなる培地100mlを500ml容量の三角フラスコに入れ121℃、15分間蒸気殺菌した。これにY-1071株を植菌し28℃で1日間、150rpmの回転振とう培養を行った。

次にこの培養液100ml分を上記表2の組成からなる培地が2L入った5L容量の通気攪拌培養槽に植菌し28℃、1.0vvmの好気培養を90時間行った。培養途

中のpHは7.2に20%NaOHで連続的に制御した。シュークロースは生育とともに消費されるので培養開始1日目および2日目にそれぞれ30gずつ添加した。培養液中の溶存酸素は、溶存酸素電極と攪拌羽根のモーターとを連動させ、溶存酸素の値に応じて回転速度を変化させる方法により自動制御した。また最低回転速度は100rpmに設定した。溶存酸素濃度はその培地における酸素の飽和濃度の比率で、それぞれ5、15、20、25、30、35%に設定した。

各条件における生成したカロテノイドの生成濃度と比率は、表7および表8に示すとおりであった。

表7

| 溶存酸素濃度 % | 色素生成濃度 mg/L | | | | | | | | | | |
|----------|-------------|------|-----|------|------|-----|-------|-----|------|-----|-------|
| | A | B | C | D | E | F | G | H | I | J | 合計 |
| 5 | 79.1 | 17.8 | 3.3 | 29.8 | 46.3 | 0.1 | 35.3 | 0.7 | 5.2 | 0.8 | 218.4 |
| 15 | 31.1 | 18.9 | 4.3 | 38.5 | 68.8 | 0.1 | 94.8 | 1.9 | 6.8 | 0.5 | 285.7 |
| 20 | 36.9 | 16.9 | 1.8 | 17.2 | 39.4 | 0.1 | 122.8 | 2.5 | 32.6 | 1.8 | 272.0 |
| 25 | 36.9 | 15.6 | 2.0 | 17.8 | 39.5 | 0.1 | 128.8 | 2.6 | 35.5 | 1.3 | 280.1 |
| 30 | 25.1 | 9.9 | 1.0 | 9.3 | 14.8 | 0.1 | 102.6 | 2.1 | 51.3 | 1.1 | 217.3 |
| 35 | 15.3 | 5.2 | 0.9 | 8.4 | 15.9 | 0.1 | 90.9 | 1.8 | 80.4 | 0.9 | 219.8 |

表8

| 溶存酸素濃度 % | 前駆体 | | G | | I | |
|----------|-------|----|-------|----|------|----|
| | mg/L | % | mg/L | % | mg/L | % |
| 5 | 177.9 | 81 | 35.3 | 16 | 5.2 | 2 |
| 15 | 164.1 | 62 | 94.8 | 36 | 6.8 | 3 |
| 20 | 116.6 | 43 | 122.8 | 45 | 32.6 | 12 |
| 25 | 115.8 | 41 | 128.8 | 46 | 35.5 | 13 |
| 30 | 63.4 | 29 | 102.6 | 47 | 51.3 | 24 |
| 35 | 48.5 | 22 | 90.9 | 41 | 80.4 | 37 |

[実施例4]

上記表1の組成からなる培地100mlを500ml容量の三角フラスコに入れ121℃、15分間蒸気殺菌した。これにA-581-1株(FERM BP-4671)を植菌し28℃で1日間、150rpmの回転振とう培養を行った。次ぎにこの培養液100ml分を上記表2の組成からなる培地が2L入った5L容量の通気攪拌培養槽に植菌し28℃、1.0vvmの好気培養を90時間行った。培養途中のpHは7.2に20%NaOHで連続的に制御した。シュークロースは生育とともに消費されるので培養開始1日目および2日目にそれぞれ30gずつ添加した。培養液中の溶存酸素は、溶存酸素電極と攪拌羽根のモーターとを連動させ、溶存酸素の値に応じて回転

速度を変化させる方法により自動制御した。また最低回転速度は100 rpmに設定した。溶存酸素濃度はその培地における酸素の飽和濃度の比率で、それぞれ5、15、20、25、30、35%に設定した。

各条件における生成したカロテノイドの生成濃度と比率は、表9および表10に示すとおりであった。

表9

| 溶存酸素濃度 % | 色素生成濃度 mg/L | | | | | | | | | | |
|----------|-------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| | A | B | C | D | E | F | G | H | I | J | 合計 |
| 5 | 0.80 | 0.20 | 0.12 | 0.55 | 0.89 | 0.00 | 0.33 | 0.00 | 0.23 | 0.01 | 3.13 |
| 15 | 0.55 | 0.48 | 0.04 | 0.82 | 1.33 | 0.00 | 1.56 | 0.00 | 0.56 | 0.02 | 5.36 |
| 20 | 0.68 | 0.42 | 0.03 | 0.36 | 0.72 | 0.00 | 2.22 | 0.00 | 0.85 | 0.02 | 5.30 |
| 25 | 0.75 | 0.29 | 0.03 | 0.35 | 0.82 | 0.00 | 2.93 | 0.00 | 1.43 | 0.02 | 6.62 |
| 30 | 0.45 | 0.29 | 0.02 | 0.15 | 0.33 | 0.00 | 1.65 | 0.00 | 1.62 | 0.02 | 4.53 |
| 35 | 0.28 | 0.06 | 0.02 | 0.12 | 0.30 | 0.00 | 1.32 | 0.00 | 1.96 | 0.02 | 4.08 |

表10

| 溶存酸素濃度 % | 前駆体 | | G | | I | |
|----------|------|----|------|----|------|----|
| | mg/L | % | mg/L | % | mg/L | % |
| 5 | 2.6 | 82 | 0.33 | 11 | 0.2 | 7 |
| 15 | 3.2 | 60 | 1.56 | 29 | 0.6 | 10 |
| 20 | 2.2 | 42 | 2.22 | 42 | 0.9 | 16 |
| 25 | 2.3 | 34 | 2.93 | 44 | 1.4 | 22 |
| 30 | 1.3 | 28 | 1.65 | 36 | 1.6 | 36 |
| 35 | 0.8 | 20 | 1.32 | 32 | 2.0 | 48 |

本明細書で引用した全ての刊行物、特許および特許出願をそのまま参考として本明細書にとり入れるものとする。

産業上の利用可能性

複数種のカロテノイド化合物の微生物学的製造法において、培養中の培養液の溶存酸素濃度を制御することにより、産生するカロテノイド化合物の生成割合を変化させることができる。

請求の範囲

1. カロテノイド化合物を複数種類産生する微生物を培養してカロテノイド化合物を製造する方法において、培養中の培養液の溶存酸素濃度を制御することにより、産生するカロテノイド化合物の生成割合を一定にすることを特徴とする方法。
2. 微生物が16SリボソームRNAに対応するDNAの塩基配列が配列番号1記載の塩基配列と98%以上の相同性を有する細菌である請求項1に記載の方法。
3. 微生物がE-396株(FERM BP-4283)およびその変異株ならびにA-581-1株(FERM BP-4671)およびその変異株から選ばれる請求項1に記載の方法。
4. カロテノイド化合物がアスタキサンチン、アドニキサンチン、 β -カロテン、エキネノン、カンタキサンチン、ゼアキサンチン、 β -クリプトキサンチン、3-ヒドロキシエキネノン、アステロイデノンおよびアドニルビンより選ばれる1種以上である請求項1に記載の方法。
5. カロテノイド化合物を複数種類産生する微生物を培養してカロテノイド化合物を製造する方法において、培養中の培養液の溶存酸素濃度を制御することにより、産生するカロテノイド化合物の生成割合を変えることを特徴とする方法。
6. 微生物が16SリボソームRNAに対応するDNAの塩基配列が配列番号1記載の塩基配列と98%以上の相同性を有する細菌であることを特徴とする請求項5に記載の方法。
7. 微生物がE-396株(FERM BP-4283)およびその変異株ならびにA-581-1株(FERM BP-4671)およびその変異株から選ばれる請求項5に記載の方法。
8. カロテノイド化合物がアスタキサンチン、アドニキサンチン、 β -カロテン、エキネノン、カンタキサンチン、ゼアキサンチン、 β -クリプトキサンチン、3-ヒドロキシエキネノン、アステロイデノンおよびアドニルビンより選ばれる1種以上である請求項5に記載の方法。
9. 培養中の培養液中の溶存酸素濃度を飽和濃度の40~100%に制御することに

よりアドニキサンチンの生成比率を高める請求項5に記載の方法。

10. 培養中の培養液中の溶存酸素濃度を飽和濃度の20～30%に制御することによりアスタキサンチンの生成比率を高める請求項5に記載の方法。

11. 培養中の培養液中の溶存酸素濃度を飽和濃度の0～10%に制御することにより β -カロテン、エキネノン、カンタキサンチン、3-ヒドロキシエキネノンおよびアドニルビンの生成比率を高める請求項5に記載の方法。

SEQUENCE LISTING

<110> Nippon Mitsubishi Oil Corporation

<120> A process for producing carotenoid pigments

<130> PH-1223-PCT

<140>

<141>

<150> JP 2000-175124

<151> 2000-06-12

<160> 2

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 1452

<212> DNA

<213> Unknown

<220>

<223> Description of Unknown Organism:E-396

<400> 1

agtttgatcc tggctcagaa cgaacgctgg cggcaggctt aacacatgca agtcgagcga 60

gaccttcggg tctagcggcg gacgggtgag taacgcgtgg gaacgtgccc ttctctacgg 120
aatagccccg ggaaactggg agtaataccg tatacgcctt ttgggggaaa gatttatcgg 180
agaaggatcg gcccgcggtg gattaggtag ttggtggggg aatggccac caagccgacg 240
atccatagct ggtttgagag gatgatcagc cacactggga ctgagacacg gccagactc 300
ctacgggagg cagcagtggg gaatcttaga caatgggggc aacctgatc tagccatgcc 360
gcgtgagtga tgaaggcctt aggggtgtaa agctctttca gctgggaaga taatgacggg 420
accagcagaa gaagccccgg ctaactccgt gccagcagcc gcggtaatac ggagggggct 480
agcgttggtc ggaattactg ggcgtaaagc gcacgtaggc ggactggaaa gtcagagggtg 540
aaatcccagg gctcaacctt ggaactgcct ttgaaactat cagtctggag ttcgagagag 600
gtgagtggaa ttccgagtgt agaggtgaaa ttcgtagata ttcggaggaa caccagtggc 660
gaaggcggct cactggctcg atactgacgc tgagggtcga aagcgtgggg agcaaacagg 720
attagatacc ctggtagtcc acgccgtaaa cgatgaatgc cagacgtcgg caagcatgct 780
tgtcgggtgc acacctaacg gattaagcat tccgcctggg gactacggtc gcaagattaa 840
aactcaaagg aattgacggg ggcccgaca agcgggtggag catgtggttt aattcgaagc 900
aacgcgcaga accttacc aa cccttgacat ggcaggaccg ctggagagat tcagctttct 960
cgtaagagac ctgcacacag gtgctgcatg gctgtcgtca gctcgtgtcg tgagatgttc 1020
ggttaagtcc ggcaacgagc gcaaccacg tccctagtgt ccagcaattc agttgggaac 1080
tctatgaaa ctgccgatga taagtcggag gaagggtgtg atgacgtcaa gtccatcatg 1140
gccttacggg ttgggctaca cacgtgctac aatgggtggg acagtgggtt aatccccaaa 1200
agccatctca gttcggattg tcctctgcaa ctcgagggca tgaagtggga atcgctagta 1260
atcgcggaac agcatgccgc ggtgaatacg ttccggggcc ttgtacacac cggccgtcac 1320
accatgggag ttggttctac ccgacgacgn tgcgctaacc ttcggggggc aggcggccac 1380
ggtaggatca gcgactgggg tgaagtcgta acaaggtagc cgtaggggaa cctgcggctg 1440
gatcacctcc tt 1452

<210> 2

<211> 1426

<212> DNA

<213> Unknown

<220>

<223> Description of Unknown Organism:A-581-1

<400> 2

tagagtittga tcctggctca gaacgaacgc tggcggcagg cttaacacat gcaagtcgag 60
cgagaccttc gggctctagcg gcggacgggt gagtaacgcg tgggaacgtg cccttctcta 120
cggaatagcc ccgggaaact gggagtaata ccgtatacgc cctttggggg aaagatttat 180
cggagaagga tcggcccgcg ttggattagg tagttggta ggtaacggct caccaagccg 240
acgatccata gctggittga gaggatgac agccacactg ggactgagac acggcccaga 300
ctcctacggg aggcagcagt ggggaatctt agacaatggg ggcaaccctg atctagccat 360
gccgcgtgag tgatgaaggc cttagggttg taaagctctt tcagctggga agataatgac 420
ggtaccagca gaagaagccc cggctaactc cgtgccagca gccgcggtaa tacggagggg 480
gctagcgttg ttcggaattia ctgggcgtaa agcgcacgta ggccgactgg aaagtcagag 540
gtgaaatccc agggctcaac cttggaactg cctttgaaac tatcagtcg gagttcgaga 600
gaggtgagtg gaattccgag tgtagagggtg aaattcgtag atattcggag gaacaccagt 660
ggcgaaggcg gctcactggc tcgatactga cgctgagggtg cgaaagcgtg gggagcaaac 720
aggattagat accctggtag tccacgccgt aaacgatgaa tgccagacgt cggcaagcat 780
gcttgctcgtt gtcacaccta acggattaaag cattccgcct ggggagtagc gtcgcaagat 840
taaaactcaa aggaattgac gggggccccg acaagcgggtg gagcatgttg ttttaattcga 900
agcaacgcgc agaaccctac caacccttga catggcagga ccgctggaga gattcagctt 960
tctcgtaaga gacctgcaca cagggtgctgc atggctgtcg tcagctcgtg tcgtgagatg 1020
ttcggttaag tccggcaacg agcgcaaccc acgtccctag ttgccagcat tcagttgggc 1080
actctatgga aactgccggt gataagccgg aggaagggtg ggatgacgtc aagtcctcat 1140
ggcccttacg ggttgggcta cacacgtgct acaatgggtg tgacagtggg ttaatcccca 1200
aaagccatct cagttcggat tgtcctctgc aactcgaggg catgaagttg gaatcgctag 1260
taatcgcgga acagcatgcc gcggtgaata cgttcccggg ccttgtagac accgcccgtc 1320
acaccatggg agttggttct acccgacgac gctgcgctaa cccttcgggg aggcaggcgg 1380
ccacggtagg atcagcgact ggggtgaagt cgtaacaagg tagcca 1426

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/04874

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int.Cl⁷ C12P23/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
Int.Cl⁷ C12P23/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
BIOSIS (DIALOG)
GeneBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|-----------|--|-----------------------|
| X | EP 635576 A1 (Nippon Oil K.K.), 25 January, 1995 (25.01.95), & US 5607839 A & NO 9402731 A & JP 7-79796 A | 1-11 |
| X | JP 8-9964 A (Nippon Oil Company, Ltd.), 16 January, 1996 (16.01.96) (Family: none) | 1-11 |
| Y | JP 5-68585 A (Higashimaru Shoyu K.K.), 23 March, 1993 (23.03.93) (Family: none) | 1-4 |
| Y | WO 88/8025 A1 (Biocolours IS), 20 October, 1988 (20.10.88), & AU 8816889 A & EP 367765 A & US 5356810 A & JP 11-69969 | 1-4 |

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.
 ☐ See patent family annex.

| | |
|---|--|
| * Special categories of cited documents: | "I" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention |
| "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance | "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone |
| "E" earlier document but published on or after the international filing date | "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art |
| "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) | "&" document member of the same patent family |
| "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means | |
| "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed | |

Date of the actual completion of the international search
05 July, 2001 (05.07.01)Date of mailing of the international search report
17 July, 2001 (17.07.01)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/04874

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|-----------|---|-----------------------|
| X | HARTMANN, A. et al., "Effect of Carotenoid Overproduction on Oxygen Tolerance of Nitrogen Fixation in Azospirillum brasiliense Sp7", Journal of General Microbiology, (1988), Vol.134, No.9, pages 2449 to 2455 | 1, 4 |

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))
Int. C1⁷ C12P23/00

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))
Int. C1⁷ C12P23/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)
BIOSIS (DIALOG)
GeneBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

C. 関連すると認められる文献

| 引用文献の カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示 | 関連する 請求の範囲の番号 |
|-----------------|---|------------------|
| X | EP 635576 A1 (NIPPON OIL KK) 25. 1月. 1995 (25. 01. 95) & US 5607839 A&NO 9402731 A&JP 7-79796 A | 1-11 |
| X | JP 8-9964 A (日本石油株式会社) 16. 1月. 1996 (16. 01. 96) (ファミリーなし) | 1-11 |
| Y | JP 5-68585 A (ヒガシマル醤油株式会社) 23. 3月. 1993 (23. 03. 93) (ファミリーなし) | 1-4 |
| Y | WO 88/8025 A1 (BIOCOLOURS IS) 20. 10月. 1988 (20. 10. 88) & AU 8816889 A&EP 367765 A&US 5356810 A&JP 11-69 | 1-4 |

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日
05. 07. 01

国際調査報告の発送日
17.07.01

国際調査機関の名称及びあて先
日本国特許庁 (ISA/JP)
郵便番号100-8915
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)
鈴木 恵理子



4N 8114

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

| C (続き). 関連すると認められる文献 | | |
|----------------------|--|------------------|
| 引用文献の カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示 | 関連する 請求の範囲の番号 |
| X | 969 HARTMANN, A. et al. Effect of Carotenoid Overproduction on Oxygen Tolerance of Nitrogen Fixation in <i>Azospirillum brasilense</i> Sp7. Journal of General Microbiology. 1988, Vol. 134, No. 9, p. 244-2455 | 1, 4 |